

Practitioner's Docket No. 30394-1064

**PATENT**

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re application of: Van Asbeck      Group No.:  
Application No.: 010 / 049,579  
Filed: February 13, 2002      Examiner:  
For: PHARMACEUTICAL PRODUCT FOR THE TREATMENT OF VIRAL INFECTIONS, IN  
PARTICULAR OF THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV)

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

**TRANSMITTAL OF CERTIFIED COPIES**

Attached please find the certified copy of the foreign application from which priority is claimed for this case:

Country:                      The Netherlands

Application Number: 1012825

Filing Date:                August 13, 1999

Country:

Application Number:

Filing Date:

**WARNING:** "When a document that is required by statute to be certified must be filed, a copy, including a photocopy or facsimile transmission of the certification is not acceptable." 37 C.F.R. § 1.4(f) (emphasis added).

Reg. No.: 35,964

Tel. No.: ( 505 ) 998-1500

Customer No.: 005179

  
SIGNATURE OF PRACTITIONER Jeffrey D. Myers

PEACOCK, MYERS & ADAMS, P.C.

(type or print name of practitioner)

Post Office Box 26927

P.O. Address

Albuquerque, New Mexico 87125-6927

**NOTE:** The claim to priority need be in no special form and may be made by the attorney or agent, if the foreign application is referred to in the oath or declaration, as required by § 1.63.

**CERTIFICATE OF MAILING (37 C.F.R. § 1.8a)**

I hereby certify that this paper (along with any paper referred to as being attached or enclosed) is being deposited with the United States Postal Service on the date shown below with sufficient postage as ~~first-class mail~~ in an envelope addressed to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

U.S. Express Mail No. EV017081215US Annette M. Turk, Legal Assistant

(type or print name of person mailing paper)

Date: May 15, 2002

  
Signature of person mailing paper

(Transmittal of Certified Copies[5-5])

**KINGDOM OF THE NETHERLANDS**  
**BUREAU FOR THE INDUSTRIAL PROPERTY**

It is herewith stated, that in the Netherlands on the 13th of August 1999 under Number 1012825, in the name of:

**FACULTEIT GENEESKUNDE UNIVERSITEIT UTRECHT**

at Utrecht, the Netherlands,

a patent application has been filed for:

*"Pharmaceutical Composition for the Treatment of Viral Infections, In Particular of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) ",*

and that the documents appended herewith fully correspond with the original documents handed in with said application.

Rijswijk, March 15, 2002

The President of the Bureau for the Industrial Property,  
for him,

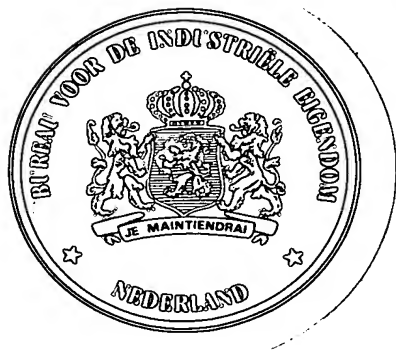
drs. N.A. Oudhof

KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

**Bureau voor de Industriële Eigendom**



Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 13 augustus 1999 onder nummer 1012825,  
ten name van:

**FACULTEIT GENEESKUNDE UNIVERSITEIT UTRECHT**

te Utrecht, Nederland

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Farmaceuticum voor de behandeling van virale infecties in het bijzonder van het humane  
immunodeficiency virus (HIV)",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 15 maart 2002

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,  
voor deze,

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'N' followed by a long horizontal stroke and a small flourish at the end.

drs. N.A. Oudhof

100235  
B. v.d. I.E.

16 AUG. 1999

UITTREKSEL

De uitvinding beschrijft een farmaceuticum voor de behandeling van virale infecties in het bijzonder van het humane immunodeficiency virus (HIV). Volgens de uitvinding omvat het farmaceuticum een preparaat dat als actief bestanddeel een ijzerchelator bevat.

5           Geschikte ijzerchelatoren zijn gekozen uit de groep van de hydroxyamaten (zoals deferoxamine), de familie van de hydroxypyridionen (zoals deferipon), en de nucleïnezuur-bindende chemotherapeutica (zoals bleomycine).

10           Een synergistisch effect wordt verkregen in vitro wanneer naast het preparaat dat de ijzerchelator bevat tevens een preparaat wordt gebruikt, dat een ander virusremmend middel bevat.

Als virusremmende verbinding komt een proteaseremmer, bij voorkeur ritonavir, in aanmerking.

15           Een ander geschikt virusremmend middel is een reverse transcriptaseremmer, bij voorkeur een dideoxyinosine.

16 AUG. 1999

Farmaceuticum voor de behandeling van virale infecties in het bijzonder van het humane immunodeficiency virus (HIV).

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een farmaceuticum voor de behandeling van virale infecties in het bijzonder van het humane immunodeficiency virus (HIV).

Virale infecties in het bijzonder infecties door het humane immunodeficiency virus (HIV) vormen een ernstige bedreiging voor de volksgezondheid. Wereldwijd worden veel inspanningen gedaan om te komen tot een farmaceuticum voor de bestrijding van deze veelal ongeneeslijke ziekte.

Het is bekend, dat ijzer betrokken is bij de replicatie van de humane immunodeficiency virus. In de eerste plaats, het HIV-1 long terminal repeat (LTR) gedeelte bevat nucleaire factor (NF)-kB respons elementen, die provirale transcriptie reguleren. NF-kB activering kan worden beïnvloed met ijzer via de productie van reactieve zuurstof species.

Een tweede route waarlangs ijzerchelatie HIV replicatie kan beïnvloeden is de remming van de DNA synthese door inactivering van ijzer-afhankelijke rebonucleotide reductase.

Een andere strategie, die kan worden toegepast bij targetting van ijzerchelatoren tegen HIV-1 is een directe virale DNA/RNA aanval.

De onderhavige uitvinding beoogt thans een farmaceuticum te verschaffen voor een efficiënte behandeling van virale infectie in het bijzonder van het humane immunodeficiency virus, waartoe het farmaceuticum het kenmerk heeft, dat het farmaceuticum een preparaat omvat dat als actief bestanddeel een ijzerchelator bevat.

Geschikte ijzerchelatoren volgens de uitvinding kunnen zijn gekozen uit de groep van de hydroxamaten (zoals deferoxamine), de familie van de hydroxypyridinonen (zoals deferipon), en de nucleïnezuur-bindende chemotherapeutica (zoals bleomycine).

Bijzonder verrassend is gebleken dat wanneer men in vitro naast het preparaat met als actief bestanddeel een ijzerchelator, tevens een preparaat dat een andere virusremmende verbinding bevat gebruikt bijzonder gunstige resultaten

worden verkregen tengevolge van het optreden van een synergistisch effect. Hierbij bleek een proteaseremmer, in het bijzonder ritonavir, bijzonder geschikt te zijn als virusremmend middel.

5 Een ander virusremmend middel dat met ijzerchelatoren een gunstige synergi oplevert is reverse transcriptaseremmer, in het bijzonder dideoxyinosine.

Aanvraagster heeft in dit verband de invloed onderzocht van deferoxiamine (DF), deferipron (L1) en bleomycine  
10 (BLM) op de HIV-1 replicatie in primaire bloedcellen. Daarbij werd gebruik gemaakt van humane perifere bloedlymfocyten (PBL) en monocytten-afgeleide macrofagen (MDM) zijnde de belangrijkste targetcellen voor HIV. Gebleken is hierbij dat de aanzienlijke afname van HIV-1 replicatie door DF gepaard ging  
15 met proliferatie-inhibitie. Soortgelijks werd waargenomen met L1. Verrassend was dat BLM de virale replicatie in PBL en MDM remde zonder invloed te hebben op de lymfocytenproliferatie. De toepassing van de combinatie van ijzerchelatoren met de op zichzelf bekende antivirale middelen voor antivirale combina-  
20 tietherapie werd onderzocht. Wanneer DF werd toegepast in combinatie met de nucleoside analoog dideoxyinosine (ddI) bleek een verrassende synergistische inhibitie van p24 in HIV-geïnfecteerde PBL op te treden.

25 De bij de studie gebruikte materialen en toegepaste methoden zijn als volgt.

#### *Cel isolatie.*

Perifere bloedmononucleaire cel (PBMC) fracties werden geïsoleerd uit gehepariniseerd bloed van HIV-1-, HIV-2-  
30 en hepatitis B-seronegatieve donoren (Bloedbank, Utrecht) via Ficoll-Isopaque gradiënt separatie. De cellen werden twee keer gewassen en vervolgens hetzij onderworpen aan een tegenstroom centrifugale elutriatie onder oplevering van monocyte fracties, hetzij liet men monocytten in de PBMC fractie hechten  
35 aan met fibronectine beklede kolven voorafgaande aan het oogsten van de PBL fractie. De monocytten hadden een zuiverheid van >95% volgens de criteria van celmorfologie op May-Grünwald-Giemsa-gekleurde cytosmeers en via niet-specifieke esterase kleuring onder gebruikmaking van  $\alpha$ -naftylacetaat

(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en PBL >85% zuiverheid via May-Grünwald-Giemsa-kleuring. Het percentage levende cellen van beide celtypes was >95% bij het begin van het experiment, zoals bepaald volgens de trypan-blauw exclusie. Geïsoleerde monocytten werden gekweekt in een suspensie bij een concentratie van  $2 \times 10^6$  cellen/ml in teflon kolven teneinde hechting tot het minimum te beperken (Nalgene, Rochester, NY), waarbij men de monocytten liet differentiëren gedurende 7 dagen. Het MDM medium bestond uit Dulbecco's gemodificeerd Eagle's medium aangevuld met 10% hitte-geïnactiveerde menselijk AB serum, negatief voor anti-HIV antilichamen (Bloedbank, Utrecht), 10  $\mu\text{g/ml}$  gentamycine (Life Technologies Ltd., Paisley, Schotland), 5  $\mu\text{g/ml}$  ciprofloxacin (Bayer, Leverkusen, Duitsland), 0,6 mg/ml L-glutamine (Sigma) en 3,4 g/L bicarbonaat (Merck, Darmstadt, Duitsland). Geïsoleerd PBL werd gedurende 3 dagen gestimuleerd te profileren onder toevoeging van 4  $\mu\text{g/ml}$  phytohemagglutinine (PHA; Sigma) in RPMI-1640 (Life Technologies Ltd.) medium aangevuld met 10% hitte geïnactiveerde foetaal kalf serum (Life Technologies Ltd.) en 10  $\mu\text{g/ml}$  gentamycine. Na PHA stimulatie werd het PBL gekweekt in een medium met daarin 10 U/ml humane recombinant IL-2 (Boehringer, Mannheim, Duitsland). Alle incubaties werden uitgevoerd in 96-druppelplaatjes met vlakke bodem bij 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en 95% lucht.

25

#### *HIV infectie en p24 metingen.*

De cellen werden gedurende 2 uur geïnfecteerd met HIV-1<sub>Ba-1</sub>. Macrofagen werden geïnfecteerd met multiplicititeit (MOI) van 0,005 en lymfocyten met een MOI van 0,001. De cellen werden vervolgens twee keer gewassen ter verwijdering van de overmaat virus en vervolgens geïncubeerd met hetzij DF (Novartis Pharma, Arnhem), LI (afkomstig van Duchefa Farma B.V., Haarlem) hetzij BLM (H. Lundbeck A/S. Kopenhagen, Denemarken) gedurende 5 dagen. Virus in het kweeksupernatant werd geïnactiveerd in een eindconcentratie van 0,05% empigen (Calbiochem-Novabiochem Co., La Jolla, CA). De aanwezigheid van HIV-1 in het geïnactiveerde supernatant werd gevolgd door controle van het p24 antigeen via de enzyme-gekoppelde immunosorbent test (ELISA).

### *Lymfocyte proliferatie metingen.*

Aangezien ijzerchelatoren cellulaire proliferatie kunnen beïnvloeden werd het effect van de drie ijzerchelatoren op PBL proliferatie onderzocht. Dit werd uitgevoerd door gedurende de nacht de  $^3\text{H}$ -thymidine ( $^3\text{H}$ -TdR) inbouw in DNA te volgen. Er werd 25  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -TdR (0,5  $\mu\text{Ci}$ , Amersham International plc, Engeland) toegevoegd in aanwezigheid van DF, L1, BLM of DF/ddI combinatie, in een totaal volume van 200  $\mu\text{l}$  celsuspensie na 4 dagen incubatie met de verschillende concentraties van de toegepaste verbinding. Celincubaties werden in 96-putjes bevattende kunststof platen (Costrar, Cambridge, MA, Amerika). Na incubatie gedurende de nacht met  $^3\text{H}$ -TdR werden de cellen geoogst onder gebruikmaking van een automatische microcelverzamelaar (Titertek® celverzakelaar 530). Het filter werd vervolgens gedroogd en ondergedompeld in een scintillatie cocktail (Wallace UK). De radioactiviteit werd geteld in een Mark II vloeibaar scintillatiesysteem (Model x, triction analytics, Inc.).

### 20 *Cytotoxiciteit.*

Mogelijke cytotoxiciteit van DF, L1 of BLM werd onderzocht door de MTT [3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnyltetrazoliumbromide] (Sigma) test.

### 25 *Studies van DF-ddI combinatie.*

Drie afzonderlijke experimenten werden uitgevoerd in hoofdzaak zoals uiteengezet onder hoofdstuk HIV infectie en p24 metingen. Meervoudig verdunde gefixeerde verhoudingscombinaties van de geneesmiddelen, of enkelvoudige geneesmiddelen werden toegevoegd bij elk incubatiepunt. De  $\text{IC}_{50}$  (remmende concentratie) voor elk geneesmiddel werd berekend onder gebruikmaking van het computer software programma CalcuSyn. Het gecombineerde geneesmiddel effect werd geëvalueerd door middel van het gemiddelde effect principe en de isobologram methode. Deze methode omvat het uitzetten van het dosis-effect curve voor elk geneesmiddel alleen dan wel in combinatie van elkaar. De helling van de gemiddelde-effect curve en de x intercept van de curve werden vervolgens toegepast voor de computerberekening van een combinatie-index



(CI). De CI waarden werden gebaseerd op de klassieke isobologram vergelijking en CI waarden van  $<1$ ,  $1$  en  $>1$  wijzen op synergisme (groter dan het verwachte additieve effect), additieve effecten en antagonisme (minder dan het verwachte additieve effect). De aangetaste fractie ( $f_a$ ) werd berekend voor elke geneesmiddelcombinatie en voor elk geneesmiddel alleen na p24 metingen in geïnfecteerd PBL geïncubeerd gedurende 5 dagen met de onderzochte verbindingen (zie HIV infectie en p24 metingen).

#### Statistische analyse.

Herhaalde metingen ANOVA en student Newman-Keuls test werden toegepast voor het analyseren van de gegevens. P waarden beneden 0,05 werden als significant beschouwd.

#### Resultaten

*Effect van DF op HIV-1 replicatie, cellulaire proliferatie en cytotoxiciteit in PBI.*

DF bleek p24 concentraties in kweek supernatanten te verlagen. Bij een concentratie van  $3 \mu\text{M}$  DF werd een 40% afname van virus replicatie in PBL (19 versus 11 ng p24/ml,  $n=3$ ,  $p<0,05$ ) waargenomen. Een concentratie aan de verbinding van  $30 \mu\text{M}$  bleek de p24 niveaus te verminderen met  $>90\%$  (fig. 1A) van 19 tot  $1,9 \text{ ng p24/ml}$  ( $n=3$ ). Teneinde de mogelijkheid uit te sluiten dat deze remmende invloed te danken zou zijn aan cytotoxiciteit werd het percentage levende cellen gemonitord. Een DF concentratie van  $100 \mu\text{M}$  bleek cytotoxisch te zijn (fig. 1B). Bovendien werd tengevolge van de anti-proliferatieve eigenschappen van DF ook de cellulaire proliferatie gemonitord. De waargenomen afname in p24 ging gepaard met een afname in proliferatie (fig. 1C). Gebleken is dat non-cytotoxische DF concentraties geschikt waren voor het doen afnemen van de HIV replicatie, welke afname gepaard ging met cellulaire proliferatie-remming.

*Effect van LI op HIV-1 replicatie, cellulaire proliferatie en cytotoxiciteit in PBL*

HIV-1 replicatie in lymfocyten nam af tot minimale

concentraties door 100  $\mu$ M L1 (fig. 2A). Deze concentratie was niet cytotoxisch in PBL (fig. 2B). Er blijkt een drempelwaarde te zijn in L1 concentratie, waarbij de remmingscurve zeer steil was, welk verschijnsel eveneens gepaard ging met een afname in proliferatie (fig. 2C). Zo kon de waargenomen HIV-inhibitie met L1 worden toegeschreven aan de cellulaire proliferatie inhibitie. Bij lagere concentraties aan de onderzochte verbinding kon een geringe toename in p24 antigeen productie worden waargenomen (fig. 2A).

*Effect van BLM op HIV-1 replicatie, cellulaire proliferatie en cytotoxiciteit in PBL.*

BLM bleek dosisafhankelijk HIV-1 replicatie te verminderen in lymfocyten (fig. 3A). Deze verbinding bleek niet cytotoxisch te zijn in PBL (fig. 3B). Bij concentraties in het traject van 3-300 ng BLM/ml bleek een 20-50% verlaging teweeg te worden gebracht, hetgeen overeenkwam met een afname van 19 tot 15 (20%) of 9,5 (50%) ng p24/ml (n=3) (fig. 3A). Cellulaire proliferatie bleef in tact (fig. 3C). Hieruit blijkt dat de HIV-1 inhibitie door BLM, in tegenstelling tot DF en L1, via een ander mechanisme verliep dan de cellulaire proliferatie inhibitie.

*Invloed van DF, L1, en BLM op HIV-1 replicatie en cytotoxiciteit in MDM.*

In MDM, DF concentraties rond de 100  $\mu$ M bleek de levende replicatie te verminderen met maximaal 50% (1,2 versus 0,6 ng p24/ml) in een dosis afhankelijke manier (fig. 4AI). Deze p24 afname bleek echter gepaard te gaan met de aantasting van de cytotoxiciteit (fig. 4AII). L1 in de bestudeerde concentraties bleek de p24 antigeen productie verrassenderwijs tweevoudig te doen toenemen bij 30  $\mu$ M (fig. 4BI). Deze concentraties bleken niet cytotoxisch te zijn (fig. 4BII).

In MDM werd voorts eveneens een dosis afhankelijke afname in p24 concentraties waargenomen met een 50% vermindering bij 300 ng BLM/ml van 1,2 tot 0,6 ng p24/ml (fig. 4CI). Gebleken is dat BLM concentraties, soortgelijke concentraties als PBL, het percentage levende cellen in MDM (fig. 4CII) niet hebben aangetast.

### *Gecombineerde antivirale invloed van DF-ddI.*

Een matig tot sterk synergisme werd waargenomen bij gebruik van DF in combinatie met ddI. Fig. 5 toont een representatieve grafiek voor de combinatie index (CI) met betrekking tot een fractie die is aangetast ( $f_a$ ) voor de inhibitie van HIV door een mengsel van DF en ddI (molair verhouding 4:1).  $IC_{50}$  van DF was  $8,5 \mu M$  en dat van ddI  $3,7 \mu M$ . Uit fig. 5 blijkt duidelijk dat er een aanzienlijk synergisme is bij alle  $f_a$ , die zijn verkregen met verschillende combinaties, waarbij het synergisme sterker is naarmate  $f_a$  toeneemt. Rondom de  $IC_{50}$  concentraties van beide DF en ddI (combinatiepunten op fig. 5:  $10 \mu M$  DF:  $2,5 \mu M$  ddI), werd de hoogste  $f_a$  waarde verkregen en de combinatie was sterk synergistisch. Cellulaire proliferatie werd gemonitord met deze combinaties met elk geneesmiddel afzonderlijk. Gebleken is dat ddI in combinatie met DF niet een additionele remmende invloed had op cellulaire proliferatie vergeleken met DF alleen.

De uitvinding wordt nader toegelicht aan de hand van figuren 1-6.

- Fig. 1. Effect van DF op HIV-1 replicatie (A), cytotoxiciteit (B) en cellulaire proliferatie (C) in PBL na 5 dagen incubatie met DF.

Voor de bepaling van de HIV-1 replicatie werden cellen 2 uur geïnfecteerd met HIV-1<sub>Ba-L</sub> bij een MOI van 0,001; de cellen werden vervolgens 2 keer gewassen en geïncubeerd met verschillende DF concentraties. Na 5 dagen werd het supernatant gebruikt voor p24 ELISA. Virus replicatie werd uitgedrukt als % p24 reductie na DF incubaties, vergeleken met p24 gemeten bij controle HIV-geïnfecteerde cellen geïncubeerd in de afwezigheid van DF (gesteld op 100% p24). Cytotoxiciteit werd bepaald met de MTT test en wordt weergegeven als % levende cellen na 5 dagen incubatie met DF, vergeleken met levende cellen van controle HIV-geïnfecteerde cellen geïncubeerd in de afwezigheid van DF (gesteld op 100% levende cellen). PBL proliferatie werd gemeten door overnacht <sup>3</sup>H-thymidine incorporatie, na 4 dagen incubatie van de cellen met DF; het is weergegeven als 'counts per minute' (cpm) na DF incubaties, vergeleken met cpm in controle cellen, geïncubeerd in de afwezigheid van DF. Resultaten zijn gemiddelden van 3 ex-

perimenten in duplo (statistische analyse met behulp van herhaalde ANOVA en student Newman-Keuls test,  $*p < 0,05$ ). 100% p24 productie komt overeen met 19 ng p24/ml.

- Fig. 2. Effect van L1 op HIV-1 replicatie (A), cytotoxiciteit (B) en cellulaire proliferatie (C) in PBL na 5 dagen incubatie met L1.

Voor de bepaling van de HIV-1 replicatie werden cellen 2 uur geïnfecteerd met HIV-1<sub>Ba-L</sub> bij een MOI van 0,001; de cellen werden vervolgens 2 keer gewassen en geïncubeerd met verschillende L1 concentraties. Na 5 dagen werd het supernatant gebruikt voor p24 ELISA. Virus replicatie werd uitgedrukt als % p24 reductie na L1 incubaties, vergeleken met p24, gemeten bij controle HIV-geïnfecteerde cellen, geïncubeerd in de afwezigheid van L1 (gesteld op 100% p24). Cytotoxiciteit werd bepaald met de MTT test en wordt weergegeven als % levende cellen na 5 dagen L1 incubatie met L1, vergeleken met levende cellen van controle HIV-geïnfecteerde cellen, geïncubeerd in de afwezigheid van L1 (gesteld op 100% levende cellen). PBL proliferatie werd gemeten door overnacht <sup>3</sup>H-thymidine incorporatie, na 4 dagen incubatie van de cellen met L1; het is weergegeven als 'counts per minute' (cpm) na L1 incubaties, vergeleken met cpm in controle cellen, geïncubeerd in de afwezigheid van L1. Resultaten zijn gemiddelden van 3 experimenten in duplo (statistische analyse met behulp van herhaalde ANOVA en student Newman-Keuls test,  $*p < 0,05$ ). 100% p24 productie komt overeen met 19 ng p24/ml.

- Fig. 3. Effect van BLM op HIV-1 replicatie (A), cytotoxiciteit (B) en cellulaire proliferatie (C) in PBL na 5 dagen incubatie met BLM.

Voor de bepaling van de HIV-1 replicatie werden cellen 2 uur geïnfecteerd met HIV-1<sub>Ba-L</sub> bij een MOI van 0,001; de cellen werden vervolgens 2 keer gewassen en geïncubeerd met verschillende BLM concentraties. Na 5 dagen werd het supernatant gebruikt voor p24 ELISA. Virus replicatie werd uitgedrukt als % p24 reductie na BLM incubaties, vergeleken met p24, gemeten bij controle HIV-geïnfecteerde cellen geïncubeerd in de afwezigheid van BLM (gesteld op 100% p24). Cytotoxiciteit werd bepaald met de MTT test en wordt weergegeven als % levende cellen na 5 dagen incubaties met BLM, vergele-

ken met levende cellen van controle HIV-geïnfekteerde cellen geïncubeerd in de afwezigheid van BLM (gesteld op 100% levende cellen). PBL proliferatie werd gemeten door overnacht <sup>3</sup>H-thymidine incorporatie, na 4 dagen incubatie van de cellen met BLM; het is weergegeven als 'counts per minute' (cpm) na BLM incubaties, vergeleken met cpm in controle cellen, geïncubeerd in de afwezigheid van BLM. Resultaten zijn gemiddelden van 3 experimenten in duplo (statistische analyse met behulp van herhaalde ANOVA en student Newman-Keuls test,

\*p<0,05). 100% p24 productie komt overeen met 19 ng p24/ml.

- Fig. 4. Effect van DF (AI-II), L1 (BI-II) en BLM (CI-II) op HIV-1 replicatie (A-CI) en cytotoxiciteit (A-CII) in MDM na 5 dagen incubatie.

Voor de bepaling van de HIV-1 replicatie werden cellen 2 uur geïnfecteerd met HIV-1<sub>Ba-L</sub> bij MOI van 0,001; de cellen werden vervolgens 2 keer gewassen en geïncubeerd met verschillende concentraties agens. Na 5 dagen werd het supernatant gebruikt voor p24 ELISA. Virus replicatie werd uitgedrukt als % p24 reductie na incubaties, vergeleken met p24, gemeten bij controle HIV-geïnfekteerde cellen, geïncubeerd in de afwezigheid van de verbindingen (gesteld op 100% p24). Cytotoxiciteit werd bepaald met de MTT test en wordt weergegeven als % levende cellen na 5 dagen incubatie, vergeleken met levende cellen van controle HIV-geïnfekteerde cellen geïncubeerd in de afwezigheid van de verbindingen (gesteld op 100% levende cellen). Resultaten zijn gemiddelden van 3 experimenten in duplo (statistische analyse met behulp van herhaalde ANOVA en student Newman-Keuls test, \*p<0,05). 100% p24 productie komt overeen met 1,2 ng p24/ml.

- Fig. 5. Grafische presentatie van de combinatie index (CI) gebaseerd op de fractie remming (fa = fraction affected) van het p24-antigeen door een mix van DF en ddI (molaire ratio 4:1). Data punten op de grafiek wordt aangegeven als conc DF en ddI beide in  $\mu$ M. CI<1, = 1 en >1 duiden respectievelijk op synergistische, additieve en antagonistische effecten. De onderverdelingen in het synergistisch gebied (CI>0,7, 0,3-0,7 en <0,3 duiden respectievelijk op matig synergisme, synergisme en sterk synergisme) is volgens Chou en Talalay. De parameters worden verkregen met de gemiddelde effectberekening

van Chou en Talalay en het CalcuSync computer software programma zoals beschreven bij "materialen en methoden". De  $IC_{50}$  van DF was  $8,5 \mu M$  en die van ddI was  $3,7 \mu M$  in dit experiment. Deze grafiek is representatief voor 3 onafhankelijke experimenten.

- Fig. 6. Grafische presentatie van de combinatie index (CI) gebaseerd op de fractie remming ( $f_a$  = fraction affected) van het p24-antigeen door een mix van bleomycine (BLM) en ritonavir (ratio 30:1). Perifere bloed lymfocyten (PBL) werden 2 uur geïnfecteerd met HIV-1<sub>Ba-L</sub> bij een MOI van 0,001. De cellen werden vervolgens 2 keer gewassen om overmaat virus te verwijderen en daarna 5 dagen geïncubeerd met alleen BLM, alleen ritonavir of verschillende combinaties van beide stoffen. Virus in het supernatant van de celkweken werd geïnactiveerd in een eindconcentratie van 0,05% empigen en de aanwezigheid van HIV-1 in het geïnactiveerde supernatant werd gemeten door bepaling van het p24 antigeen met enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).  $CI < 1$ ,  $= 1$  en  $> 1$  duiden respectievelijk op synergistische, additieve en antagonistische effecten, volgens Chou en Talalay. De parameters worden verkregen met de gemiddelde effectberekening (median effect equation) van Chou en Talalay en het CalcuSync computer software programma. De  $IC_{50}$  van BLM was  $1,9 \mu g/ml$  en die van ritonavir was  $0,04 \mu M$  in dit experiment. Deze grafiek is representatief voor twee onafhankelijke experimenten.

CONCLUSIES

1. Farmaceuticum voor de behandeling van virale infecties in het bijzonder van het humane immunodeficiency virus (HIV), met het kenmerk, dat het farmaceuticum een preparaat omvat dat als actief bestanddeel een ijzerchelator  
5 bevat.

2. Farmaceuticum volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de ijzerchelator gekozen is uit de groep van de hydroxamaten (zoals deferoxamine), de familie van de hydroxypyridionen (zoals deferipon), en de nucleïnezuur-bindende  
10 chemotherapeutica (zoals bleomycine).

3. Farmaceuticum volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat het farmaceuticum naast het preparaat dat de ijzerchelator bevat tevens een preparaat omvat, dat een ander virusremmend middel bevat.

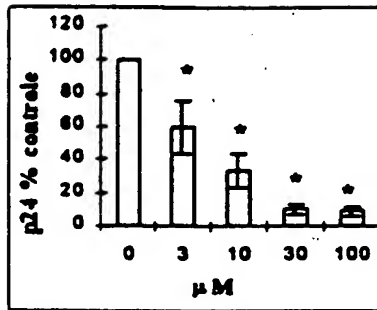
15 4. Farmaceuticum volgens conclusie 3, met het kenmerk, dat het virusremmende middel een proteaseremmer is.

5. Farmaceuticum volgens conclusie 4, met het kenmerk, dat de proteaseremmer ritonavir is.

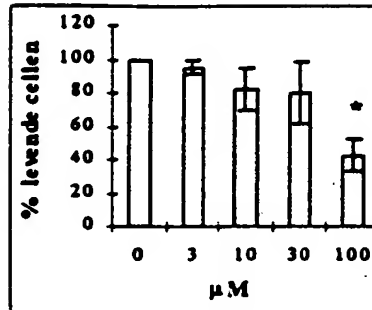
20 6. Farmaceuticum volgens conclusie 3, met het kenmerk, dat het virusremmende middel een reverse transcriptase-remmer is.

25 7. Farmaceuticum volgens conclusie 6, met het kenmerk, dat de reverse transcriptaseremmer een dideoxyinosine is.

A: p24 antigen



B: aantal levende cellen



C: proliferatie

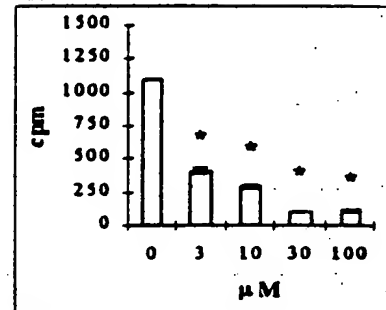


FIG. 1



1012023

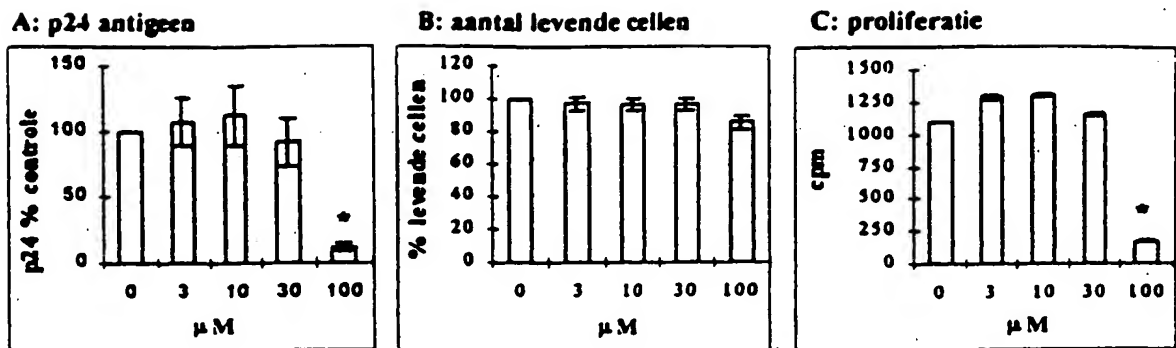


FIG. 2

10 III B

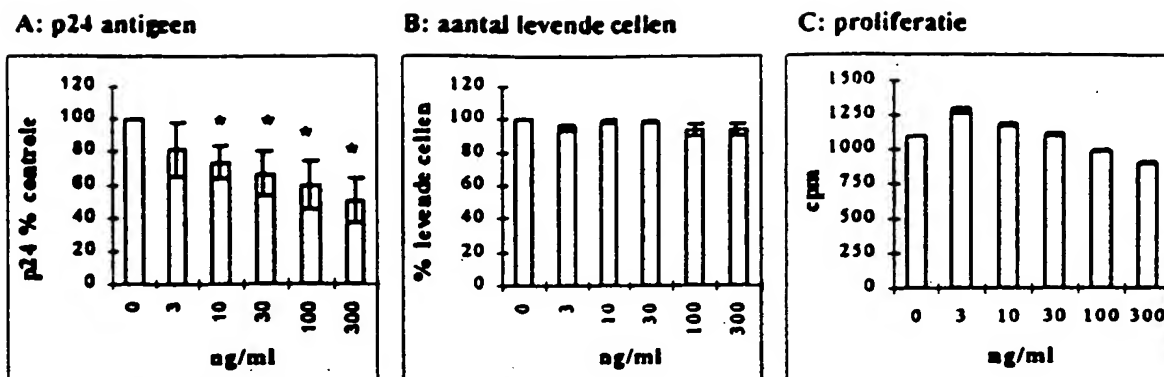


FIG. 3

10 III C

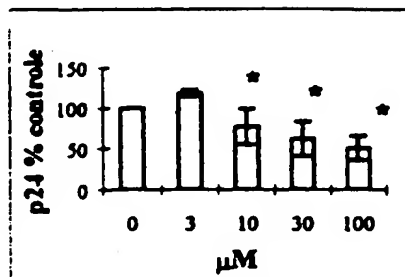
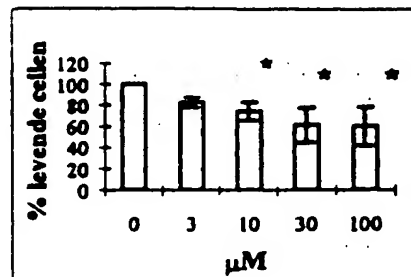
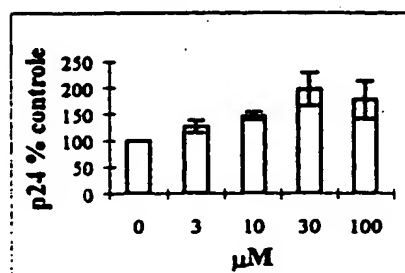
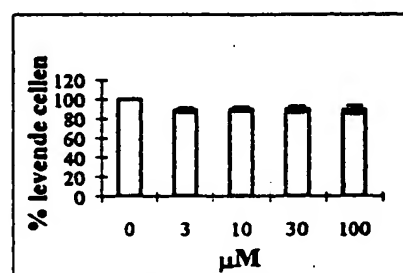
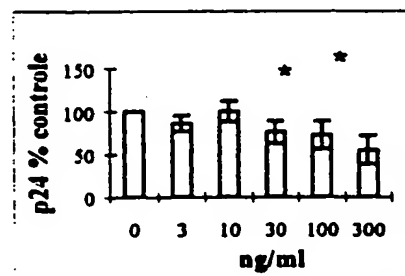
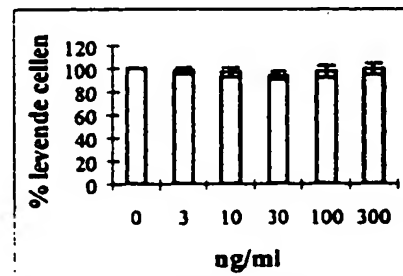
**A: Deferoxamine (DF)****I: p24 antigeen****II: aantal levende cellen****B: Deferiprone (L1)****I: p24 antigeen****II: aantal levende cellen****C: Bleomycine (BLM)****I: p24 antigeen****II: aantal levende cellen**

FIG. 4

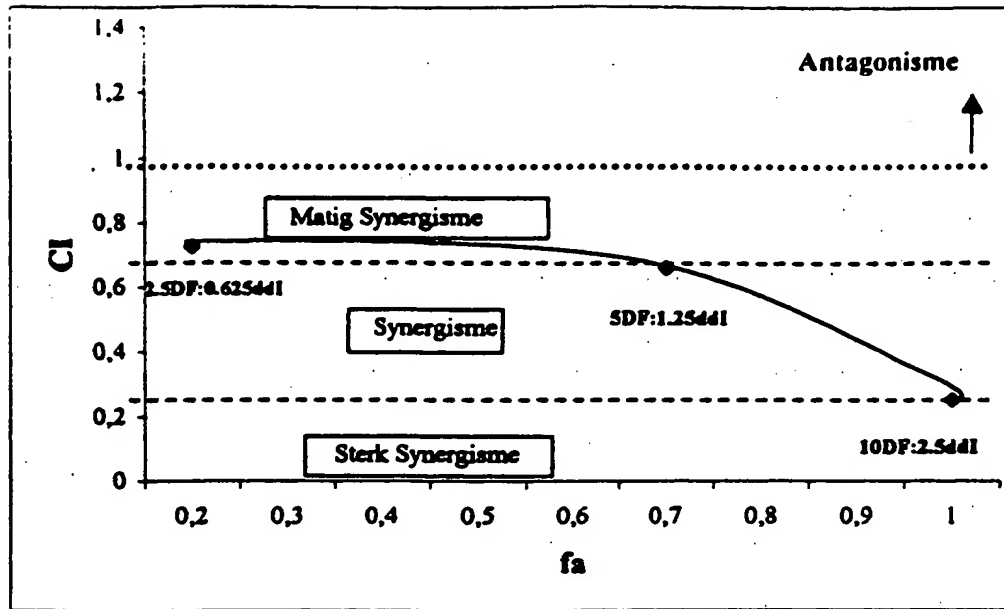


FIG. 5